



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos termos da Lei 5.152 de 21/10/1966 – São Luís – Maranhão
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (Modalidade: Bacharelado)

FERNANDA JENIFFER OLIVEIRA LINDOSO

**CARACTERIZAÇÃO DE AMILASES DE *Ucides cordatus* E SEU POTENCIAL USO
COMO BIOMARCADOR DE METAIS PESADOS**

SÃO LUIS/MA

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos termos da Lei 5.152 de 21/10/1966 – São Luís – Maranhão
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (Modalidade: Bacharelado)

**CARACTERIZAÇÃO DE AMILASES DE *Ucides cordatus* E SEU POTENCIAL USO
COMO BIOMARCADOR DE METAIS PESADOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Profa. Dra. Talita da Silva Espósito

SÃO LUIS/MA

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Lindoso, Fernanda Jeniffer Oliveira.

CARACTERIZAÇÃO DE AMILASES DE *Ucides cordatus* E SEU
POTENCIAL USO COMO BIOMARCADOR DE METAIS PESADOS /

Fernanda Jeniffer Oliveira Lindoso. - 2018.

45 f.

Orientador(a): Talita da Silva Espósito.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Amilase. 2. Caranguejo. 3. Crustáceos. 4.

Recurso pesqueiro. I. Espósito, Talita da Silva. II.

Título.

FERNANDA JENIFFER OLIVEIRA LINDOSO

**CARACTERIZAÇÃO DE AMILASES DE *Ucides cordatus* E SEU POTENCIAL USO
COMO BIOMARCADOR DE METAIS PESADOS**

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^a. Talita da Silva Espósito (Orientadora)
Departamento de Oceanografia e Limnologia - UFMA

Prof^o. Dr^a. Alexandra Martins do Santos Soares
Departamento de Engenharia Química - UFMA

Prof^o. Dr^a. Marianna Basso Jorge
Departamento de Oceanografia e Limnologia - UFMA

A Deus, dono dos meus dias, meu protetor,
Aos meus pais Geovani e Antonia, vocês me guiaram para que eu pudesse
chegar até aqui. Minhas irmãs Mickelle e Bruna, vocês são incríveis!

Com todo meu amor!

Salmos 37:04

“
**Deleita-te também no Senhor, e Ele te concederá
os desejos do teu coração.”**

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes. (Marthin Luther King)”

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço por toda a vida que há em mim. Por tudo o que tens feito e ainda vais fazer, A Ele toda Glória, toda minha vida, todo meu louvor!

A minha professora orientadora Dra. Talita da Silva Espósito, pelo voto de confiança, amizade, incentivo e oportunidade de trabalhar na área de biotecnologia de organismos aquáticos, agradeço também os momentos alegres de trabalhos, permitindo uma convivência agradável, conversas, ensinamentos, foram preciosos! As discussões e contribuições científicas e o auxílio na correção dos trabalhos e deste manuscrito, sempre com toda a calma e paciência que lhe são característicos. Minha imensa gratidão, respeito e carinho. Muito obrigada!

Allysson, seu coração me emociona. Obrigada por dividir seus tesouros comigo, porque assim eles se tornam nossos. Obrigada por somar forças nessa trajetória, sua companhia e amizade foram essenciais. Estamos apenas começando querido amigo. Um irmão na adversidade ganhei.

Pai, mãe, Bruninha, Mickelle, Junior, Ester, Gustavo, Isadora, vó e vô, vocês são a minha base! Obrigada pelas orações e todo o apoio.

À Marcelo Fernandes, por toda generosidade e bondade, pelo auxílio prestado em meus experimentos, agradeço sua dedicação, interesse e cuidado, de coração, muito obrigada amigo. Aos colegas de laboratório, Suelma, Mônica, Yohana, Jéssica, Marllen, pela troca de experiências, apoio e companheirismo, conversas, brincadeiras sendo muito mais que um simples ambiente de trabalho.

Agradeço aos membros que compõe a banca avaliadora por disporem do seu tempo para me auxiliar na etapa final desse trabalho.

A FAPEMA pelo apoio financeiro.

RESUMO

As vísceras do processamento do pescado têm apresentado uma importante fonte de biomoléculas com potencial aplicação industrial. Neste trabalho avaliou-se o potencial de amilases de vísceras de caranguejo como biomarcador de metais pesados. Para extração das enzimas foram utilizadas vísceras extraídas de *Ucides cordatus*. A partir deste material obteve-se o extrato bruto que foi submetido por um processo de purificação parcial realizado em duas etapas: tratamento térmico e precipitação salina com sulfato de amônio. A fração saturada com 30- 60% de sulfato de amônio apresentou maior atividade específica com rendimentos de 7,2%. Nesta fração verificou-se em que temperatura e pH as amilases apresentaram maior atividade e foram realizadas eletroforeses de acordo com o método de Laemmli (1970), usando gel de acrilamida. Os efeitos de íons metálicos sobre a atividade amilolítica os íons Ca, Cu , Hg , Al , Ba , Fe, Mg e Na, foram avaliados nas concentrações 0,007; 0,0007 e 0,00007 mM. A atividade amilolítica foi fortemente inibida por Hg em 95%. Os pesos das proteínas foram estimados em 30-34 kDa. As amilases de *Ucides cordatus* se mostraram sensíveis a um metal pesado, por terem sua atividade fortemente inibida pelo mercúrio, o que pode sugerir a o potencial uso das amilases como biomarcador para este metal.

Palavras chaves: Caranguejo, crustáceos, recurso pesqueiro, amilase.

ABSTRACT

The viscera of the fish processing have presented an important source of biomolecules with potential industrial application. In this work the potential of crab viscera amylases as a heavy metal biomarker was evaluated. For the extraction of the enzymes, viscera extracted from the of *Ucides cordatus* . From this material the crude extract was obtained, which was submitted by a semi-purification process carried out in two stages: thermal treatment and saline precipitation with ammonium sulfate .The fraction presenting the highest amylolytic activity was further studied (30-60% of ammonium sulfate) resulting in 7.2%. In this fraction, it was verified in which temperature and pH the amylases presented for higher activity and electrophoreses were performed according to the method of Laemmli (1970) . The effect of metal ions on the amylolytic activity of the Ca, Cu, Hg, Al, Ba, Fe, Mg and Na ions was evaluated at 0.007; 0.0007 e 0.00007 mM concentrations. Amylolytic activity was strongly inhibited by Hg in 95%. The proteins weight was estimated at 30-34 kDa. The amylases of *Ucides cordatus* showed to be sensitive to a heavy metal, because their activity is strongly inhibited by mercury, which may suggest the potential use of amylases as a biomarker for this metal.

Keywords: Crab, Crustaceans, fishing waste, amylase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produtos que podem ser obtidos através do processamento de *Ucides cordatus*.....7

Figura 2: Mapa do continente americano com a distribuição das subespécies do gênero *Ucides*, adaptado de Diele (2000).....8

Artigo: POTENCIAL USO DE AMILASES DE *Ucides cordatus* COMO BIOMARCADOR DE METAIS PESADOS

Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE das amilases obtidas dos hepatopâncreas de *Ucides cordatus* . No perfil 1 : padrão de peso molecular; Perfil 2: fração obtida da semi-purificação com sulfato de amônio. O peso molecular foi estimado em 30-34 kDa.....33

Figura 2. Efeitos de (a) pH, (b) temperatura os ensaios foram realizados com valores de pH de 4,0 a 11,5 e as temperaturas variando de 10 a 70 ° C.....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: semi-purificação de amilases de <i>Ucides cordatus</i> do hepatopâncreas. Proteína total e Atividades enzimáticas foram estabelecidas, respectivamente de acordo com Warburg and Christian (1941) e de Bernfeld (1955) utilizando amido solúvel 2% como substrato. Extrato bruto (EB), extrato bruto aquecido (EBA), fração 1 (F1), fração 2 (F2).....	32
Tabela 2. Efeito de íons em amilases semi-purificadas de <i>Ucides cordatus</i> . Os resultados são representados por média \pm desvio padrão.....	36

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

EB – Extrato bruto

EBA – Extrato Bruto aquecido

F1 – Fração 1

F2 – Fração 2

SF – Sobrenadante final

Al – Alumínio

Ba - Bário

Ca – Cálcio

Cu - Cobre

Fe - Ferro

Hg – Mercúrio

Mg – Magnésio

Na – Sódio

kDa- Quilo Daltons

DNS – cido de Dinitrosalicílico

SD – Desvio Padrão

SDS- Sódio dodecil sulfato

pH-Potencial hidrogênico

SDS–PAGE – Gel de poliacrilamida

MMA – Ministério do Meio Ambiente

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

FAO - Food And Agriculture Organization

SUMÁRIO

	Pag
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	4
2.1 Objetivo geral.....	4
2.2 Objetivos específicos	4
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 Gerenciamento de resíduos de recursos pesqueiros.....	5
3.2 <i>Ucides cordatus</i>.....	8
3. Biomarcadores e metais pesados.....	10
3.4 Enzimas.....	12
3.5. Amilases.....	14
4 REFERENCIAS.....	16
5 ARTIGO.....	24
6 ANEXO.....	42

1. INTRODUÇÃO

O ambiente marinho está continuamente sujeito à poluição química proveniente das atividades antropogênicas que podem aumentar a descarga de elementos químicos metálicos pesados em várias concentrações nos ecossistemas aquáticos naturais (PAPAGIANNTIS *et al.*, 2004) e prejudicar os organismos aquáticos que vivem naquele ambiente (ALINK, 1982). Esta contaminação ocorre devido ao uso extenso de metais nos processos agrícolas, químicos e industriais (PREGO & CO BELO-GARCIA, 2003; CHEUNG *et al.*, 2004). Os elementos tendem a acumular-se em organismos, possuem estabilidade química ou baixa biodegradabilidade. (HELLAWELL, 1986; SANDERS, 1997). Alguns metais pesados são essenciais ao metabolismo normal de organismo; e outros não-essenciais, por não possuírem nenhum papel biológico significativo (SANDERS, 1997; EC, 2001). Entre os essenciais para os organismos marinhos estão: Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn (BRYAN, 1979). Todos os metais, essenciais ou não-essenciais são tóxicos em altas concentrações, Ag, Cd, Cu, Hg e Pb particularmente tóxicos (BRYAN, 1979; EC, 2001).

Durante análises ambientais, poluentes como pesticidas e metais são geralmente detectados pela inibição de uma atividade enzimática promovida por estes contaminantes tóxicos (COSTA *et al.*, 2007). Uma vez que a análise direta de tais substâncias não fornece informações sobre seu efeito direto no ecossistema, o uso de biomonitores ou biomarcadores é uma opção altamente recomendada porque estes respondem especificamente a quantidade de contaminante disponível (RUELAS-INZUNZA & PÁEZ-OSUNA, 2000).

Os biomarcadores medem a interação entre um sistema biológico e um agente ambiental, podendo ser físico, químico ou biológico (WHO/IPCS, 1993). Estes podem ser conceituados como “indicadores de curto prazo” de efeitos biológicos em longo prazo (CAJARAVILLE *et al.*, 2000)

Dentre esses organismos se destacam os animais aquáticos, foco de vários estudos sobre contaminação de metais, pois absorvem tanto os metais essenciais, como não essenciais, a partir da água e pela ingestão de alimento, os efeitos adversos destas substâncias químicas podem prejudicar o transporte de nutrientes através das células epiteliais (MERT *et al.* 2014). Embora o papel central de enzimas digestivas nos processos de clivagem e absorção de alimentos sejam bem conhecidos, poucos estudos examinaram a atividade destas enzimas sob efeito de contaminantes e seu potencial

como biomarcadores. A exposição de concentrações sub-letais de metais pesados pode interferir na atividade enzimática digestiva da espécie exposta, e promover uma redução da captação de energia, afetando a sobrevivência, o crescimento e a reprodução dos organismos (DE COEN & JANSSEN, 1997; DE COEN *et al.*, 1998). Esses efeitos no metabolismo energético podem ocorrer, pois as células digestivas estão conectadas às células de armazenamento de carboidratos e lipídios (BODAR *et al.*, 1990).

Entre os crustáceos, o *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) - faz parte da família Ucidiidae de acordo com Stevčić (2005) e Ng *et al.* (2008). Esta espécie ocupa uma posição particularmente importante devido à sua distribuição geográfica contínua (Amapá a Santa Catarina no Brasil, de acordo com Castro *et al.*, 2008). Vive exclusivamente em ecossistemas tropicais e subtropicais de manguezais, onde constrói tocas no sedimento (HATTORI E PINHEIRO, 2003) e usa as folhas e os propágulos de manguezais como fonte de alimento (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013). É um componente central da macrofauna do mangue bentônico (Alves e NISHIDA, 2004) e um recurso pesqueiro vital para os pescadores artesanais (Rodrigues *et al.*, 2000).

A principal glândula digestiva dos crustáceos é o hepatopâncreas onde é produzida e secretada a maior parte das enzimas digestivas (ICELY & NOTT, 1992; LEMOS *et al.*, 2000). O hepatopâncreas dos crustáceos é análogo ao fígado dos vertebrados sendo essencialmente composto por microtúbulos. Como no caso do fígado dos vertebrados, o hepatopâncreas dos invertebrados é um órgão sensível aos danos causados por poluentes existentes no meio externo (LI e COL., 2007).

Embora algumas espécies de crustáceos habitem ambientes com altas concentrações de metais pesados, suas funções vitais, de modo geral, mantêm-se preservadas. Porém, podem ocorrer alterações nos processos de excreção e formas de destoxificação (HARRIS & SANTOS, 2000) ao interferir na atividade das enzimas de um modo geral.

A α -amilase é uma endocarbohidrase que é encontrada em diversos organismos, como exemplo, os animais, fungos, bactérias e vegetais. Ela é responsável pela hidrólise ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ presentes em macromoléculas de amido e glicogênio, gerando como produtos oligossacarídeos, α -dextrinas e maltose (GUPTA *et al.*, 2003; VAR DER MAAREL, 2003; GUANDALINI, 2007; CASTRO *et al.*, 2010). Dentre as enzimas industriais, atualmente as amilases representam aproximadamente 25% do mercado enzimático mundial, apresentando grande aplicação biotecnológica (GUPTA, 2003 BORGIO, 2011; KUMAR, SAHAI e BISARIA, 2012).

Dentre os vários setores onde esta enzima é utilizada, destacam-se a hidrólise do amido, produção de bioetanol, produção de açúcar e cerveja, indústria têxtil e curtume, indústria alimentícia, e na formulação de detergentes como aditivo de limpeza (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002), são produzidas por micro-organismos, principalmente bactérias (MITIDIERI, 2006). No entanto, é importante investigar novas fontes dessas enzimas, com a finalidade de descobrir novas formas de amilases e também buscar redução nos custos de produção (BURHAN *et al.*, 2003).

O presente trabalho tem como o objetivo de caracterizar amilases digestivas de *Ucides cordatus*, como biomarcadoras de metais pesados em amostras ambientais.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Caracterizar e avaliar o potencial de amilases extraídas do hepatopâncreas do caranguejo *Ucides cordatus* como um biomarcador de metais pesados.

2.2 Objetivos específicos

- Obter frações com atividade amilolítica a partir do extrato bruto do hepatopâncreas do caranguejo *Ucides cordatus* ;
- Determinar a fração de melhor rendimento;
- Caracterizar os parâmetros físico-químicos e cinéticos de amilases semi-purificadas do hepatopâncreas de *Ucides cordatus*;
- Avaliar a sensibilidade da proteína parcialmente purificada aos íons Fe^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+3} , Al^{+3} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , e Na^{+} nas concentrações de 0,007; 0,0007 e 0,00007 mM.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Gerenciamento de resíduos de recursos pesqueiros

O novo relatório da FAO, o Estado Mundial da Pesca e Aquicultura 2016 (SOFIA) estima que o Brasil deve registrar um crescimento de 104% na produção da pesca e aquicultura em 2025. Segundo o estudo, o aumento na produção brasileira será o maior registrado na região, seguido de México (54,2%) e Argentina (53,9%) durante a próxima década. O crescimento no país se deve aos investimentos feitos no setor nos últimos anos. Em âmbito global, a produção deve crescer até alcançar 195,9 milhões de toneladas em 2025, um aumento de 17% em comparação a produção de 2013-15, de 166,8 milhões, após 2014 registrar pela primeira vez aumento na produção aquícola para o consumo direto em relação às capturas por pesca (FAO 2016).

Segundo a FAO (2014), o número de pessoas que dependem da pesca e da aquicultura como fonte de renda e alimentação é cada vez maior, estimando que cerca de 10 % a 12 % da população mundial dependam diretamente dessas atividades. Contudo, as ingerências dos recursos ambientais ameaçam a sustentabilidade da atividade. No Brasil o consumo per capita de produtos derivados do pescado deve aumentar nas próximas décadas, fazendo com que o setor seja cada vez mais dependente da aquicultura (ROCHA *et al.* 2013).

Com o contínuo crescimento da aquicultura e do largo volume de pescado processado, a indústria pesqueira tem gerado grandes quantidades de resíduos e subprodutos. Segundo (FERREIRA., 2014), aproximadamente de 50% do pescado produzido é descartado na forma de resíduo. No ano de 2010 a produção foi de 154.000.000t de pescado no mundo (FAO, 2012a), aproximadamente 77 milhões de toneladas de resíduos pesqueiro, gerando uma fonte de desperdício de recursos de baixo custo e de contaminação ambiental. Dessa forma, preocupados com problemas ambientais, em todo o mundo pesquisas vêm sendo desenvolvidas para obtenção de métodos que possibilitem a transformação desses resíduos em produtos passíveis de utilização na indústria e na alimentação humana e animal (VIANE., 2014).

É de grande importância utilizar a matéria-prima em toda a sua extensão para obtenção de subprodutos e coprodutos, evitando a própria formação do resíduo. Quando o resíduo é gerado deve-se planejar o seu aproveitamento, tendo como consequência minimizar desperdícios de resíduos que podem ser proveitosos para a indústria, redução

dos custos de produção e poluição ambiental, pois com a criação de alternativas tecnológicas, teremos como resultado o desenvolvimento sustentável (ANBE, 2011; ESPINDOLA-FILHO, 1997).

Os organismos aquáticos representam uma importante fonte de biomoléculas ativas, como carotenoides (SANTOS, 2006), gelatina (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2007) peptídeos bioativos com atividade anti-hipertensiva, antitrombótica, imunomoduladora e antioxidante, e as enzimas (KIM e MENDIS, 2006), quitina e quitosana (SHAHIDI e JANAKKAMIL, 2001; KIM e MENDIS, 2006), e colágeno (HWANG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007; NALINANON *et al.*, 2007). Assis *et al.* (2007) extraíram acetilcolinesterase de cérebro de tambaqui e a aplicaram na detecção de inseticidas. Várias proteases foram extraídas e purificadas de diversas espécies de peixes e caranguejos destacando características interessantes para aplicações diversas (BEZERRA *et al.*, 2001; ALENCAR *et al.*, 2003; BEZERRA *et al.*, 2005; KLOMKLAO *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2007; ESPÓSITO *et al.*, 2009-a, 2009-b; BEZERRA *et al.*, 2002), incluindo manejo de resíduos, amaciamento de carnes, extração de óleo de peixe, produção de ômega-3, ação antioxidante e antibacteriana (SHAHIDI e KAMIL, 2001), formulação de detergentes (ESPÓSITO *et al.*, 2009), e produção de hidrolisado proteico (ASPMO *et al.*, 2005).

Em comum, todas as produções de pescados, seja para uso comercial ou experimental, produzem resíduos sólidos. Os resíduos da industrialização do pescado podem ser direcionados para várias modalidades de aproveitamento: alimentos para consumo humano, alimentos para consumo animal (rações), dietas parenterais hipoalergênicas (através da extração de proteínas de baixo peso molecular de acordo com pesquisas feitas por Marquez *et al.*, 2004, fertilizantes ou adubos orgânicos, bicomustível, produtos químicos, e ainda é possível aproveitá-los no desenvolvimento de produtos funcionais como quitosana, cálcio de ostra e óleo rico em Omega-3 (NUNES, 2011).

As carapaças de caranguejo são fontes ricas em quitina. No Brasil, as principais áreas de ocorrência e produção deste crustáceo estão concentradas nas regiões Norte e Nordeste, as quais contribuem com 70% da produção nacional. O caranguejo-uçá-*Ucides cordatus* é o segundo maior crustáceo encontrado nos ecossistemas de mangue, sendo preferencialmente explorado para o consumo humano (DE CASTRO *et al.*, 2008). Muitos métodos têm sido desenvolvidos para recuperação dos componentes

químicos, como proteínas, quitina e carotenoides entre outros, a partir de resíduos do processamento de crustáceos (CAHÚ *et al* 2012)

Figura 1. Produtos que podem ser obtidos através do processamento de *Ucides cordatus*



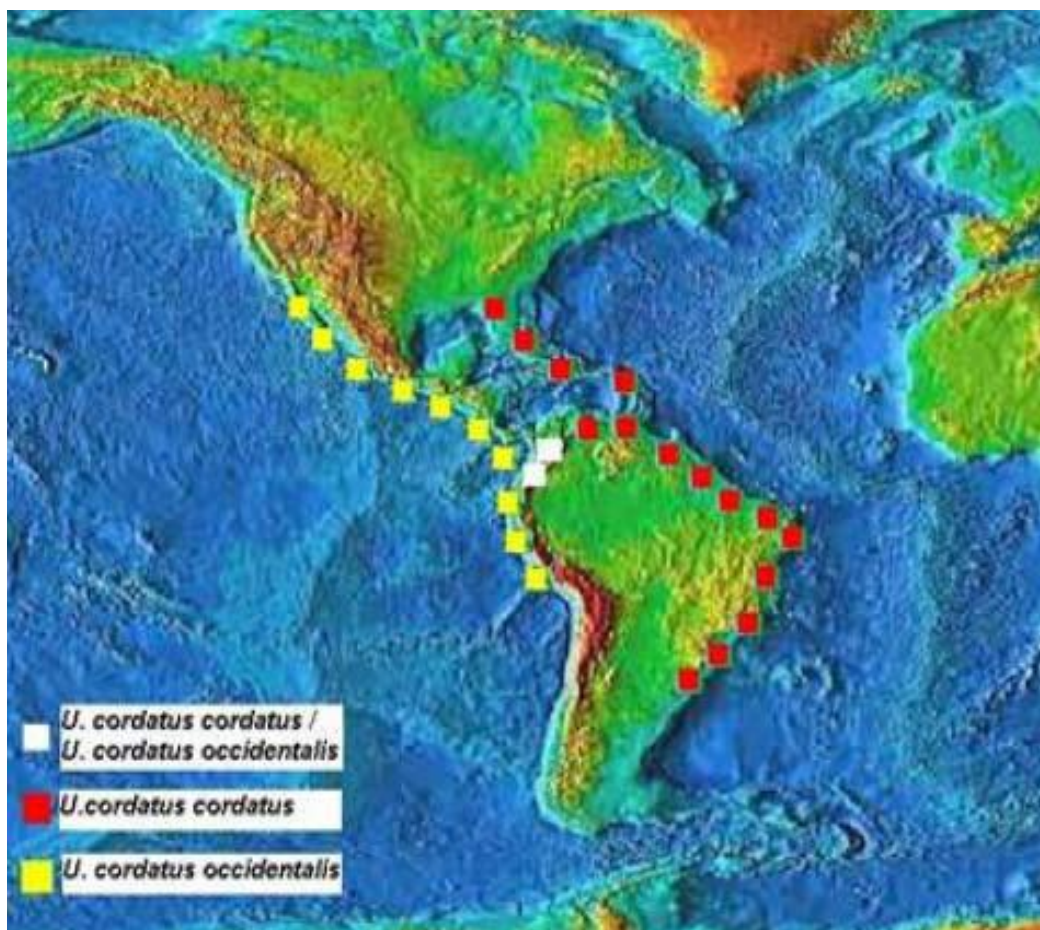
Fonte: Foto do autor

Entre os subprodutos do pescado, as vísceras são reconhecidas como uma potencial e importante fonte de enzimas digestivas, entre as principais estão as proteases e amilases com alta atividade e que atuam em uma ampla faixa de pH e condições de temperatura (BEZERRA *et al.*, 2002; SHAHIDI JANAK e KAMIL, 2001). A obtenção de enzimas a por meio de subprodutos da pesca é de grande importância uma vez que enzimas digestivas de baixo custo poderiam promover novas aplicações na indústria com o auxílio da biotecnologia, além de evitar o descarte indevido e a degradação desses insumos no meio ambiente (KLOMKLAO *et al.*, 2008).

3.2 *Ucides cordatus*

O caranguejo *Ucides cordatus* popularmente conhecido no Brasil como caranguejo-uçá, catanhão, caranguejo do mangue ou caranguejo-verdadeiro (BRANCO, 1993), teve sua ocorrência registrada pela primeira vez no litoral brasileiro no início do século XIV pelos viajantes portugueses (MELO, 1996). Ocorre no Atlântico ocidental (Figura 2): Flórida, Golfo do México, Antilhas, Norte da América do Sul, Guianas, e Brasil (do Amapá até Santa Catarina) (BRANCO, 1993).

Figura 2. Mapa do continente americano com a distribuição das subespécies do gênero *Ucides*, adaptado de Diele (2000).



O caranguejo-uçá, requer uma alimentação relativamente simples, baseada principalmente de folhas dos mangues que caem na lama, como também fungos acumulados. Apresenta carapaça subelíptica e uma coloração que varia de azulada a arroxeada e avermelhada. Os quelípodos têm tamanhos desiguais para machos e fêmeas. E nos machos é possível identificar uma franja de pelos nos pereópodos, a qual é

reduzida ou ausente nas fêmeas (MELO, 1996), enquanto que o abdome das fêmeas é mais largo para acoplar a massa ovígera.

A Caracterização Sistemática do Caranguejo *Ucides cordatus* (CASTILHO, 2006), é formada por:

- Filo: Arthropoda;
- Classe: Crustácea;
- Ordem: Decapoda;
- Infraordem: Brachyura;
- Família: Ocypodidae;
- Gênero: *Ucides*;
- Espécie: *Ucides cordatus*.

O caranguejo *Ucides cordatus* está amplamente distribuído em habitats ao longo da costa brasileira habitando em tocas individuais com até 1 metro de profundidade, situadas abaixo das árvores do mangue. Além destes, uma alta pressão predatória do *Ucides cordatus* é exercida pelos seres humanos que usam o caranguejo como alimento (ALVES e *et al.*, 2005).

U. cordatus desempenha funções importantes em áreas de manguezal, como processamento da serrapilheira, fluxo energético, ciclagem de matéria orgânica e bioturbação do sedimento (NORDHAUS *et al.*, 2006). É uma espécie muito resistente com habilidade de suportar condições adversas como a disponibilidade limitada de água (devido às inundações da maré e exposição do substrato), a alta salinidade intersticial e a baixa concentração de oxigênio nas galerias (LIMA *et al.*, 2010).

Os invertebrados têm sido utilizados para a avaliação ambiental, pois são os principais componentes em todos os ecossistemas, além de numerosos, podem ser amostrados para análises sem grandes impactos danosos à dinâmica populacional (DEPLEDGE e FOSSI, 1994). Os crustáceos, por sua vez, podem acumular contaminantes, e, no entanto, serem resistentes à sua toxicidade. E esta é uma das características que possibilita que representantes desse grupo sejam utilizados no monitoramento da contaminação do ambiente marinho (COSSA, 1989). Nesse contexto, estudos têm indicado que o caranguejo *U. cordatus* é excelente biomonitor poluição dos manguezais (SANTOS, 2002; NUDI *et al.*, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2012, 2013) que pode sofrer alterações bioquímicas e morfológicas em diferentes tecidos a partir da

exposição à um contaminante. *U. cordatus* é uma espécie potencialmente bioacumuladora de metais (SANTOS, 2002; NUDI *et al.*, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2012, 2013). Mas, em contra partida, corresponde à espécie de caranguejo mais explorada para o consumo humano no Brasil (OLMOS e SILVA, 2003).

3.3 Biomarcadores e metais pesados

Táxons que são sensíveis aos poluentes de origem antrópica podem mostrar alterações bioquímicas e morfológicas em diferentes tecidos (CARVALHO-NETA e ABREU-SILVA, 2013). Essas alterações podem ser avaliadas para diferentes espécies e são conhecidas como biomarcadores (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

U. cordatus desempenha funções importantes em áreas de manguezal, como processamento da serrapilheira, fluxo energético, ciclagem de matéria orgânica e bioturbação do sedimento (NORDHAUS *et al.*, 2006). É uma espécie muito resistente com habilidade de suportar condições adversas como a disponibilidade limitada de água (devido às inundações da maré e exposição do substrato), a alta salinidade intersticial e a baixa concentração de oxigênio nas galerias (LIMA *et al.*, 2010).

A simples presença de um xenobiótico em um ambiente aquático não pode por si só indicar um efeito deletério a este ambiente, sendo necessários estudos que permitam identificar os efeitos que os poluentes estão causando aos organismos vivos desses ecossistemas (COSTA *et al.*, 2008). Tal análise pode ser realizada a partir do hepatopâncreas do caranguejo, que além de ter uma função de armazenamento, também desempenha um papel semelhante ao fígado em animais vertebrados e é o órgão onde a biotransformação ocorre (BAYEN, 2012). Os caminhos de transformação (rotas metabólicas) percorridos pelos xenobióticos no organismo, onde os tecidos os tornam mais polares são denominados de biotransformação. Muitas vezes a biotransformação pode originar um composto metabólito mais tóxico que a molécula original, processo este denominado bioativação. Os compostos bioativados podem produzir lesões ao vencer as barreiras de proteção gerando, no organismo, respostas tóxicas (RAPOSO, 2002).

Com a crescente urbanização e conseqüente industrialização das regiões costeiras, a contaminação por espécies metálicas no ambiente marinho tem se tornado um problema recorrente em muitos países (PAN e WANG, 2012; MACHADO *et al.*, 2016). As maiores fontes de poluição por metais em sistemas aquáticos incluem o

processamento industrial de minérios, lixiviação de lixões e áreas agrícolas, queima de combustíveis fósseis, deposição atmosférica e despejo de efluentes domésticos e industriais (BRYAN, 1976; KENNISH, 2002).

Os metais pesados são os elementos químicos que apresentam densidade maior que 5g/cm³. Acredita-se que os metais sejam os agentes tóxicos mais antigos conhecidos pelo homem. Há aproximadamente 2.000 anos a.C., grandes quantidades de chumbo eram obtidas, como subproduto da fusão da prata. Todas as formas de vida são afetadas pela presença de metais dependendo da dose e da especiação. Muitos metais são essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, desde as bactérias até mesmo o ser humano, mas eles são requeridos em baixas concentrações e podem efeitos deletérios sobre a saúde quando presentes acima das concentrações essenciais.

Os metais são classificados em:

- ✓ Elementos essenciais: sódio, potássio, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel e magnésio;
- ✓ Micro-contaminantes ambientais: arsênico, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho e tungstênio;
- ✓ Elementos essenciais e simultaneamente micro-contaminantes: cromo, zinco, ferro, cobalto, manganês e níquel.

Alguns elementos são tóxicos: mercúrio, chumbo, cádmio, cobre, níquel, cobalto. Os três primeiros segundo COSTA (2005) são tóxicos para animais, os três últimos são denominados fito tóxicos por serem mais tóxicos para plantas que para animais.

Os metais pesados constituem a maior fonte poluidora inorgânica de solos e águas, sendo introduzidos no ambiente, principalmente através de fertilizantes, pesticidas, combustão de carvão e óleo, emissões veiculares, mineração, fundição, refinamento e incineração de resíduos urbanos e industriais (SCHWANZ, 2008).

Wu (2010) apresentou resultados que mostram uma escala de classificação de metais no solo quanto à gravidade de risco ecológico como Hg> Cd> Pb> Cu> Cr> As> Zn, no qual avaliou do risco potencial ecológico de metais pesados no solo. Esses dados indicam o Pb como o terceiro elemento potencialmente tóxico, confirmando a necessidade de gerenciamento de regiões que apresentam contaminação com este elemento.

Os metais apresentam afinidade com enxofre e nitrogênio, elementos comuns em muitas proteínas e aminoácidos. Devido a essa afinidade, há uma variedade de sítios

de ligação para os metais no interior das células, o que pode impedir o funcionamento metabólico normal de proteínas e moléculas e tornando-os potencialmente tóxicos (RAINBOW, 1997). A concentração de metais acumulados nos organismos pode ser dividida em duas categorias: metais metabolicamente disponíveis e metais detoxificados (que não desempenham papel metabólico, essencial ou deletério). Os efeitos tóxicos dependem da concentração de metal bioacumulado na forma metabolicamente disponível. A toxicidade ocorre quando a taxa de assimilação excede as taxas de excreção e detoxificação combinadas e os efeitos tóxicos ocorrem quando há um acúmulo excessivo de metais na forma metabolicamente disponível (RAINBOW, 2002; RAINBOW, 2007; RAINBOW & LUOMA, 2011; TAN & WANG, 2012).

Logo, o uso de enzimas como biomarcadores pode auxiliar na avaliação dos estressores e seus efeitos sobre os organismos presentes nesses locais contaminados. Uma vez que o aumento ou a inibição da atividade enzimática podem indicar algum tipo de resposta ao estresse ambiental, como consequência de atividade antrópica. CONGO *et al.*, (2009). Para tanto, faz-se necessário uma padronização nessas metodologias e de biomarcadores que possam contribuir para a avaliação e diagnósticos dos impactos a que estão sujeitas estas regiões específicas do Brasil (CARVALHO-NETA *et al.*, 2014).

3.4 Enzimas

O atual avanço tecnológico e a crescente procura por novos produtos, levaram ao aumento da busca por novas técnicas cada vez mais eficazes para aumentar a produção. O processamento através de métodos enzimáticos apresenta ser uma alternativa promissora no aumento da produção, devido à sua alta especificidade da reação catalisada, da velocidade com que se adquire o produto sem a geração de outros produtos secundários (síntese química) e diminuição de gastos com matéria prima e energia (BOUGATEF, 2013a).

Durante todo o percurso da evolução, as enzimas desenvolveram-se para diminuir seletivamente as energias de ativação das reações necessárias para a sobrevivência dos organismos. A ação catalítica das enzimas aumenta a velocidade da reação sem afetar seu equilíbrio. Essas biomoléculas são muito mais eficientes do que os catalisadores sintéticos ou inorgânicos, pois apresentam maior especificidade pelo seu substrato, originam menos subprodutos indesejados, aumentam mais a velocidade

de reação e, geralmente, não exigem temperaturas, pressão ou pH extremos para atuarem (VOET *et al.*, 2000)

A atividade catalítica de uma enzima se constitui em um meio sensível e específico para sua mensuração. Assim, para se medir a quantidade de uma enzima em uma amostra, mede-se a velocidade de reação catalisada pela enzima. Os resultados são geralmente expressos em unidades enzimáticas e as quantidades relativas de enzima em diferentes extratos podem ser então comparadas. Uma unidade de enzima pode ser definida como a quantidade de substrato que reage ou do produto formado por minuto (MURRAY, 2002). Na ausência da catálise, a maior parte das reações nos sistemas biológicos ocorreria de forma muito lenta fazendo com que a formação de seus produtos fosse diminuída, não atendendo em tempo hábil, os processos metabólicos e fisiológicos de um determinado organismo (BERG, TYMOCZKO *et al.*, 2004). A eficiência das enzimas em catalisar reações é tal que a 20 velocidades de uma reação pode ser aumentada em até 10 vezes (CAMPBELL e FARRELL, 2007).

Alguns fatores como, por exemplo, a temperatura, a concentração dos reagentes e o pH, afetam a velocidade das reações alterando a atividade enzimática. A elevação da temperatura pode aumentar a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima até o limite no qual essa temperatura seja responsável pelo rompimento das ligações fracas que conferem a estrutura secundária-terciária da enzima e cause sua desnaturação. Embora haja enzimas que trabalhem bem em pH alcalinos, neutros ou ácidos, valores extremos podem desnaturá-las ou causar alterações em sua carga elétrica, alterando sua atividade (CASTRO, 2009).

As enzimas podem ainda ter sua atividade alterada pela presença de inibidores. A inibição pode ser irreversível, quando o inibidor se liga ao sítio ativo da enzima causando alterações estruturais. Os inibidores reversíveis podem ser de dois tipos: competitivos e não competitivos. O primeiro apresenta semelhança estrutural com o substrato e se liga ao sítio ativo, formando um complexo enzima-inibidor e impedindo a ligação da enzima ao substrato. Diferentemente do inibidor irreversível, não há alteração na estrutura da enzima. O inibidor não competitivo se liga a outra região da enzima provocando uma alteração em sua estrutura, principalmente em torno do sítio ativo, impedindo a reação de catálise mesmo quando o substrato está ligado a ela.

Enzimas obtidas através de peixe e outros organismos aquáticos demonstram ser uma alternativa para o mercado de enzimas. Subprodutos da pesca e da aquicultura,

tem sido descartado de maneira inapropriada no ambiente, gerando impactos para este (ARVANITOYANNIS; KASSAVETI, 2008).

3.4 Amilases

As amilases são enzimas amplamente encontradas nos tecidos de animais, plantas, fungos, leveduras e bactérias. De acordo com o tipo de reação e os polissacarídeos produzidos através de sua catálise, elas podem ser classificadas em: α , β e γ -amilase (ARAI *et al.*; GASPERICK *et al.*; NIKOLOV e REILLY, 1991).

A α -amilase [EC 3.2.1.1] é uma endocarbohidrase responsável pela hidrólise de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ presentes no amido e glicogênio. Nesse processo são produzidos maltose, maltotriose e oligossacarídeos maiores a partir da amilose; maltose, glicose e dextrinas através da amilopectina (WILD, 1964).

Essas enzimas apresentam estrutura tridimensional altamente conservada, havendo homologia entre amilases de diferentes fontes. Sua conformação básica consiste de uma cadeia polipeptídica única dobrada em três domínios: A, B, e C (FRIFEDBERG, 1983; PRAKASH & JAISWAL, 2010).

Amilases de origem animal, na sua maioria, apresentam atividade ótima entre 30 e 50°C e na faixa de pH 7.0 - 7.2, apresentando maior tolerância a meios alcalinos do que ácidos. Sua atividade decresce com o tempo, com o aumento de temperatura e concentração de pequenos sacarídeos como glicose e maltose, que inibem sua ação hidrolítica (SHERMAN *et al.*, 2005). Diferenças na atividade da α -amilase também podem resultar através das propriedades do substrato digerido. Estudos que avaliaram a ação da α -amilase pancreática de porco sobre amido de várias fontes vegetais encontraram diferentes graus de hidrólise, o que sugere que a atividade amilolítica depende da organização das estruturas de amilose e amilopectina presentes no substrato ao qual a enzima é exposta (PRINGSHEIM e GINSBURG, 1936).

A atividade da amilase, em geral, foi considerada por vários autores sendo mais dependente de hábitos nutricionais que a atividade proteolítica. Sabe-se que caranguejos, apresentam alta atividade amilolítica devido a importância de glicose para a regulação funções de vários órgãos, como cérebro e músculo, e para a resposta ao estresse ambiental diferente (VERRI *et al.*, 2001; LORENZON *et al.*, 2005, 2007). Enzimas como as amilases e lipases são menos estudadas quando comparadas às proteases, entretanto alguns autores relataram a presença de uma atividade considerável

destas enzimas no hepatopâncreas de caranguejos (VERRI *et al.*, 2001; GAXIOLA *et al.*, 2005).

Essas enzimas possuem grande importância industrial, exibindo várias aplicações, que vão desde a indústria alimentícia à produção de biocombustíveis. Uma vez que cada aplicação diferente requer amilases com propriedades específicas, se torna necessária a busca por novas fontes destas enzimas (GUPTA *et al.*, 2003).

4. REFERENCIAS

1. _____/IPCS. Environmental health Criteria 155. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. IPCS, World Health Organization, Geneva, 1993.
2. ALENCAR, R.B.; BIONDI, M.M.; PAIVA, P.M.G.; VIEIRA, V.L.A.; CARVALHO JR, L.B.; BEZERRA, R.S. Alkaline proteases from the digestive tract of four tropical fishes. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.6, p.279-284, 2003.
3. ALINK, G. M. Gentoxins in waters. In: SORNA, M; VANIO, H (eds). *Mutagens in our Environment*. Alan R. liss, New York, p 261-276, 1982.
4. Alves, R.R.N. and Nishida, A.K.. Population structure of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) in the Estuary of the Mamanguape River, Northeast Brazil. *Tropical Oceanography*, 32(1): 23-37. 2004.
5. ASPMO, S.I.; HORN, S.J.; EIJSINK, V.G.H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, v.40, p.1957-1966, 2005.
6. BEZERRA, R.S., LINS, E.J.F., ALENCAR, R.B., PAIVA, P.M.G., CHAVES, M.E.C., COELHO, L.C.B.B., CARVALHO JR., L.B. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry*, v.40, p.1829-1834, 2005.
7. BEZERRA, R.S.; SANTOS, J.F; PAIVA, P.M.G; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; VIEIRA, V.L.A.; CARVALHO JR., L.B. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Food Biochemistry*, V. 25, p. 199-210, 2001.
8. BORGIO, J. F. Immobilization of microbial (wild and mutant strains) amylase on coconut fiber and alginate matrix for enhanced activity. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 01, n. 03, p. 255-264, 2011.
9. BRANCO, J. O., Aspectos bioecológicos do caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus) do Manguezal do Itacorubi. *Biol. Tecnol.* , 36 (1): 133 - 148, 1993.
10. BRYAN, G. W. Bioaccumulation of marine pollutants. *Philos trans. R. Soc. Lond. Ser. B*, v. 286, 483-505, 1979.

11. BURHAN A, NISA U, GOKHAN C, OMER C, ASHABIL A, propriedades Osman G. enzimática de um termofílico novela, alcalina e amilase resistentes quelante de um *Bacillus sp alkalophilic*. Isolar ANT-6. *Processo Biochem.*; 38 : 1397-1403, 2003.
12. CAJARAVILLE MP, BEBIANNO MJ, BLASCO J, PORTE C, SARASQUETE, VIARENGO A The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ* 247: 201–212, 2000.
13. DE CASTRO, A. C. L.; CORREIA, M. M. F.; NASCIMENTO, A. R.; PIEDADE JÚNIOR, R. N.; GAMA, L. R. M.; SOUSA, M. M.; SENA, A. C. S. & SOUSA, R. C. C. - Aspectos bioecológicos do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus cordatus*, L.1763) (Decapoda, Brachyura) nos manguezais da ilha de São Luís e litoral oriental do Estado do Maranhão, Brasil. *Amazônia: Cienc. & Desenv.*, 3, p.17 .2008.
14. CAHÚ, T. B.; SANTOS, S. D.; MENDES, A.; CÓRDULA, C. R.; CHAVANTE, S. F.; CARVALHO, L. B.; NADER, H. B. & BEZERRA, R. S. - Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste- *Proces. Biochem.*, 7, p.570 . 2012.
15. CASTILHO, G. G., Aspectos Reprodutivos do Caranguejo – Uçá, *Ucides cordatus* (Crustácea, Brachyera, Ocypodidade), na Baía de Antonina, Paraná. Curso de Pós – Graduação em Ciências Veterinárias, UFPA,. Dissertação de Mestrado, 102p. 2006.
16. CASTRO, A. M.; CARVALHO, D. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO , L. R. Economic analysis of the production of amylases and other hydrolases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of babassu cake. *Enzyme Research*, p. 1-9, 2010.
17. CASTRO, A.C.L.; CORREIA, M.L.F.; NASCIMENTO, A.R.; PIEDADE-JUNIOR, R.N.; GAMA, L.R.M.; SOUSA, M.M.; SENA, A.C.S. and Sousa, R.C.C.. Aspectos bioecológicos do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus* L., 1763) (Decapoda, Brachyura) nos manguezais da ilha de São Luís e litoral oriental do Estado do Maranhão, Brasil. *Amazônia: Ciência & Desenvolvimento*, 3(6): 17-2008.

18. CHEUNG, C. C. C; SIU, W. H. L; RICHARDSON, B. J; DE LUCA-ABBOTT, S. B.; LAM, P. K. S. Antioxidant responses to benzo [a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Eviron Pollut.*, 128, p. 393-403, 2004.
19. CHRISTOFOLETTI, R.A.; HATTORI, G.Y. AND PINHEIRO, M.A.A.. Food selection by a mangrove crab: temporal changes in fasted animals. *Hydrobiologia*, 702: 63-72,2013.
20. COSTA, C. N. et al. Fracionamento sequencial de cádmio e chumbo em solos. *Ciência Rural*, v. 37, n. 05, p. 1323-1328, 2007.
21. COSTA, H.M.S.; FREITAS-JÚNIOR, A.C.V.; AMARAL, I.P.G.; HIRATA, I.Y.; PAIVA, P.M.G.; CARVALHO Jr., L.B ; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R.S. Metal-sensitive and thermostable trypsin from the crevalle jack (*Caranx hippos*) pyloric caeca: purification and characterization. *Chemistry Central Journal*, V. 7, p. 166, 2013.
22. DE COEN, W.M., JANSSEN, C.R.. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing: IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery* 6, 43 – 55, 1997.
23. DIELE, K., Life history and population structure of the exploited mangrove crab *U. cordatus* (L.) (Decapoda: Brachyura) in the Caeté estuary, North Brazil, Zentrum für Zentrum für Marine Tropenökologie – ZMT. Bremen, 2000, 130 p.
24. EC. Commission Regulation No. 466/2001 of 8 March 2001, Official journal of European communities 1.77/1, 2001.
25. ESPÓSITO, T.S.; AMARAL, I.P.G.; BUARQUE, D.S.; OLIVEIRA, G.B.; CARVALHO JR., L.B.; BEZERRA, R.S. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chemistry*, v. 112, p. 125-130, 2009-a.
26. ESPÓSITO, T.S.; AMARAL, I.P.G.; MARCUSCHI, M.; CARVALHO JR.; BEZERRA, R.S. Surfactants- and oxidants-resistant alkaline proteases from common carp (*cyprinus carpio*) processing waste. *Journal of Food Biochemistry*, v.33, p. 821-834, 2009-b.
27. FAO, Food And Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Production Crops. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 14jun. 2014.

28. FRANÇA, R.C.P.; AMARAL, I.P.G.; SANTANA, W.M.; SOUZA-SANTOS, L.P.; CARVALHO JR, L.B.; BEZERRA, R.S. Proteases from the harpacticoid copepod *tisbe biminiensis*: comparative study. *Journal of Crustacean Biology*, v. 30, p. 122-128, 2010.
29. FREITAS-JÚNIOR, A.C.V.; COSTA, H.M.S.; BEZERRA, R.S.; ICIMOTO, M.Y.; MARCONDES, M.; OLIVEIRA, V.; HIRATA, I.Y.; CARVALHO JR, L.B. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chemistry*, V. 133, p. 1596-1602, 2012.
30. GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; TURNAY, J.; FERNÁNDEZ-DÍAS, M.D. et al. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, v.16, n.1, p.25-34, 2002.
31. GUANDALINI, N. C. Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium ansioptiae* utilizando resíduos amiláceos como substrato. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2007.
32. GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological Enzyme Research perspective. *Process Biochemistry*, v. 38, no. 11, p. 1599–1616, 2003.
33. HARGER, C.; SPRADA, D HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: *Bioquímica das Fermentações*,. 56 p. 1982
34. HATTORI, G.Y. AND PINHEIRO, M.A.A.. Fertilidade do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (Linnaeus) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) em Iguape, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20(2): 309-313. 2003.
35. HELLAWELL JM Os indicadores biológicos de poluição de água doce e gestão ambiental. Elsevier, Londres, p 546, CrossRef. .1986.
36. HWANG, J.; MIZUTA, S.; YOKOYAMA, Y.; YOSHINAKA, R. Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja Kenojei*). *Food Chemistry*, v.100, p.921- 925, 2007.
37. IBAMA. 2004. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Instrução Normativa Interministerial do Ministério do Meio Ambiente (MMA) nº 05/2004, de 21 de maio de. Reconhece como espécies ameaçadas de extinção e espécies sobre exploradas ou ameaçadas de sobre exploração, os invertebrados aquáticos e peixes, constantes dos Anexos à Instrução Normativa, Brasília, DF. *Diário Oficial da União*, 102: 136-142. 2004.

38. ICELY, J.D., NOTT, J.A.,. Digestion and absorption: Digestive system and associated organs. Em: Microscopic Anatomy of Invertebrates. Vol. 10, Decapoda Crustacea, Nova Iorque. Ed. Wiley-Liss, p 147-201. 1992.
39. KISHIMURA, H; HAYASHI, K; MIYASHITA,Y; NONAMI, Y. Characteristics of two trypsin isozymes from the viscera of Japanese anchovy (*Engraulis japonica*). Journal of Food Biochemistry, v. 29, p. 459-469, 2005.
40. KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, K.; SIMPSON, B.K.; SAEKI, H. Trypsins from yeallowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: purification and characterization. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, v.144, p.47-56, 2006.
41. KUMAR, V.; SAHAI, V.; BISARIA, V. S. Production of amylase and chlamydospores by *Piriformospora indica*, a root endophytic fungus. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 1, p. 124-128, 2012.
42. LEADLAY, P. F. An Introduction to Enzyme Chemistry. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, p.82, 1993.
43. LI, N; ZHA, Y. ; YANG, J. Impact of waterborne copper on the structure of gills and hepatopancreas and its impact on the content of metallothionein in juvenile giant freshwater prawn *macrobrachium rosenbergii* (crustacean: Decapoda). Arch environ contam toxicol 25(1) : 73-79, 2007.
44. MELO, G. A. S. Manual de identificação dos brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. São Paulo: Editora Plêiade, 1996.
45. MERT, R.; ALAS, A.; BULUT, S.; ÖZCAN, M.M.. Determination of heavy metal contents in some freshwater Fishes. Environmental Monitoring and Assessment, 186: 8017–8022. 2014
46. MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. Bioresour. Technol., v. 97, p. 1217–1224, 2006.
47. MMA.. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº 445/2014, de 18 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos. Diário Oficial da União, 256: 126-130. 2014
48. NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). Food chemistry, v.104, p.593-601, 2007.

49. NICOLAU, C.F. AND OSHIRO, L.M.Y.. Distribuição espacial, sazonal e estrutural do caranguejo *Aratus pisonii* (H. Milne Edwards) (Crustacea, Decapoda, Sesamidae) do manguezal de Itacuruçá, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(2): 463-469. 2007
50. NIKOLOV, Z. L; REILLY, P. Enzymatic depolymerization of starch. In: Tonathan S (ed.). *Biocatalysts for Industry*. Plenum Press, p. 37–62, 1991.
51. NUDI AH, WAGENER ALR, FRANCIONI E, SCOFIELD AL, SETTE CB, VEIGA A Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. *Environ Internat* 33: 315–327,.2007.
52. NUNES, MARIA LUCIA. Farinha de pescado. Capítulo de livro: *Tecnologia do pescado: ciência tecnologia, inovação e legislação*. Editor Alex Augusto Gonçalves. São Paulo : Editora Atheneu, 2011.
53. PAPAGIANNIS, L., KAGALOU, L., LEONARDOS, J., PETRIDIS, D., e KALFAKAKOU, V.,. Cobre e zinco em quatro espécies de peixes de água doce do lago Pamvotis (Grécia). *Environ. Int.*, 30: 357-362, 2004.
54. PINHEIRO MAA, DUARTE LFA, TOLEDO TR, ADAM ML, TORRES RA. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil *Environ Monit Assess* 185(10): 8273-8285.2013
55. PINHEIRO MAA, SILVA PPG, DUARTE LFA, ALMEIDA AA, ZANOTTO FP Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). *Ecotoxicol Environ Saf* 81: 114–121 2012.
56. PRAKASH, H.; JAISWAL, T.S. α -amilase: An ideal representative of thermostable Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 167, n. 7, p.2123-2124, 2009.
57. PREGO, R; COBELO-GARCIA,A. Twentieth century overview of heavy metals in the galician Rias (NW Iberian Peninsula). *Environ. Pollut.*, v 121, p. 425-452, 2003.
58. ROCHA, Carlos Magno Campos da et al. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v. 48, n. 8, p. iv-vi, 2013.

59. RODRIGUES, A.M.T.; BRANCO, E.J.; SACCARDO, S.A. AND BLANKENSTEYN, A.. A exploração do caranguejo *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) e o processo de gestão participativa para normatização da atividade na região sudeste-sul do Brasil. Boletim .do Instituto de Pesca, 26(1): 63-78. 2000.
60. RUELAS-INZUNZA, J.R., PÁEZ-OSUNA, F. Comparative bioavailability of trace metals using filter-feeder organismos in a subtropical coastal environmente (Southeast Gulf of California). Environ. Pollut., v. 107, p. 437-444, 2000.
61. SALEEM, A.; EBRAHIM, M. K. H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. Journal of Taibah University for Science, v.8, p. 90-97, 2014.
62. SANDER MJ A avaliação de campo do caranguejo de água doce, *potamonautes warreni* , como um indicador de bio-acumulativos de poluição por metais. M.Sc. Tese. Universidade Afrikaans Rand, África do Sul, 1997.
63. SANTOS, F.M.S.; RIBEIRO, K.; FREITAS-JUNIOR, A.C.V.; CARVALHO JR, L.B.; VALENTI, W.C.; BEZERRA, R.S. Digestive proteases from wild and farmed male morphotypes of the amazon river prawn (*Macrobrachium amazonicum*). Journal of Crustacean Biology, V. 32, p. 189-198, 2014.
64. SHAHIDI, F.; JANAKKAMIL, Y.V.A. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. Trends in Food Science e Technology. Vol. 12, pp. 435-464, 2001.
65. SOUZA, A.A.G.; AMARAL, I.P.G.; ESPÍRITO SANTO, A.R.; CARVALHO JR, L.B.; BEZERRA, R.S. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). Food Chemistry, v.100, p.1429-1434, 2007.
66. ŠTEVČIĆ, Z.. The reclassification of brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura). Natura Croatica, 14(1): 1-159. 2005
67. VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; AND DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, J. Biotechnol., v. 94, p. 137–155, 2002.
68. WARBURG O, CHRISTIAN W: Isolierung und Kristallisation des Garunges Ferments enolasc. Biochem Z 1941, 3190:384–421. 1941.

- 69.** ZHANG, Y.; LIU, W.; LI, G.; SHI, B.; MIAO, Y.; WU, X. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Food Chemistry, v.103, p.906-912, 2007.

**Artigo: CARACTERIZAÇÃO DE AMILASES DE *Ucides cordatus* E SEU
POTENCIAL USO COMO BIOMARCADOR DE METAIS PESADOS**

A ser submetido ao periódico Boletim do laboratório de Hidrobiologia

**CARACTERIZAÇÃO DE AMILASES DE *Ucides cordatus* E SEU POTENCIAL
USO COMO BIOMARCADOR DE METAIS PESADOS**

Fernanda J. O. Lindoso¹.

Marcelo F. Rodrigues².

Allysson K. de C. Silva¹,

Talita S. Espósito².

¹Departamento de Biologia - DEBIO, Universidade Federal do Maranhão, 65065-545

São Luís – MA, Brasil.

Email: fernanda.jeniffer.oliveira@gmail.com e allyssonkayron@hotmail.com

²Departamento de Oceanografia e Limnologia - DEOLI, Universidade Federal do

Maranhão, 65065-545 São Luís – MA, Brasil.

Email: marcello571@outlook.com: e talitaesposito@yahoo.com.br

RESUMO

As vísceras do processamento do pescado têm apresentado uma importante fonte de biomoléculas com potencial aplicação industrial. Neste trabalho avaliou-se o potencial de amilases de vísceras de caranguejo como biomarcador de metais pesados. Para extração das enzimas foram utilizadas vísceras extraídas de *Ucides cordatus*. A partir deste material obteve-se o extrato bruto que foi submetido por um processo de purificação parcial realizado em duas etapas: tratamento térmico e precipitação salina com sulfato de amônio. A fração saturada com 30- 60% de sulfato de amônio apresentou maior atividade específica com rendimentos de 7,2%. Nesta fração verificou-se em que temperatura e pH as amilases apresentaram maior atividade e foram realizadas eletroforeses de acordo com o método de Laemmli (1970), usando gel de acrilamida. Os efeitos de íons metálicos sobre a atividade amilolítica os íons Ca, Cu, Hg, Al, Ba, Fe, Mg e Na, foram avaliados nas concentrações 0,007; 0,0007 e 0,00007 mM. A atividade amilolítica foi fortemente inibida por Hg em 95%. Os pesos das proteínas foram estimados em 30-34 kDa. As amilases de *Ucides cordatus* se mostraram sensíveis a um metal pesado, por terem sua atividade fortemente inibida pelo mercúrio, o que pode sugerir a o potencial uso das amilases como biomarcador para este metal.

Palavras chaves: Caranguejo, crustáceos, recurso pesqueiro, amilase.

CHARACTERIZATION OF AMYLASES OF *Ucides cordatus* AND ITS POTENTIAL USE AS A BIOMARCADOR OF HEAVY METALS

ABSTRACT

The viscera of the fish processing have presented an important source of biomolecules with potential industrial application. In this work the potential of crab viscera amylases as a heavy metal biomarker was evaluated. For the extraction of the enzymes, viscera extracted from the of *Ucides cordatus*. From this material the crude extract was obtained, which was submitted by a semi-purification process carried out in two stages: thermal treatment and saline precipitation with ammonium sulfate. The fraction presenting the highest amylolytic activity was further studied (30-60% of ammonium sulfate) resulting in 7.2%. In this fraction, it was verified in which temperature and pH the amylases presented for higher activity and electrophoreses were performed according to the method of Laemmli (1970). The effect of metal ions on the amylolytic activity of the Ca, Cu, Hg, Al, Ba, Fe, Mg and Na ions was evaluated at 0.007; 0.0007 e 0.00007 mM concentrations. Amylolytic activity was strongly inhibited by Hg in 95%. The proteins weight was estimated at 30-34 kDa. The amylases of *Ucides cordatus* showed to be sensitive to a heavy metal, because their activity is strongly inhibited by mercury, which may suggest the potential use of amylases as a biomarker for this metal.

Keywords: Crab, Crustaceans, fishing waste, amylase.

INTRODUÇÃO

O ambiente marinho está continuamente sujeito à poluição química proveniente das atividades antropogênicas que podem aumentar a descarga de metais em várias concentrações nos ecossistemas aquáticos naturais PAPAGIANNTIS *et al.*, (2004) e prejudicar os organismos aquáticos que vivem naquele ambiente ALINK, (1982). Alguns metais são essenciais ao metabolismo normal de organismo; e outros não-essenciais, por não possuírem nenhum papel biológico importante SANDERS, 1997; EC, (2001). Entre os essenciais para os organismos marinhos estão: Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn BRYAN, (1979).

As metodologias utilizadas para avaliar a presença de poluentes no ambiente, na sua grande maioria são bastante caras. Monitorar a ação desses poluentes através de organismos vivos é um tema bastante discutido nas ciências ambientais, por serem mais eficientes do que as medidas instantâneas de parâmetros físicos e químicos ESTEVES, (1998), ZHOU *et al* (2008).

As enzimas podem ser usadas como biomarcadores de contaminação aquática, uma vez que o aumento ou a inibição da atividade enzimática podem indicar algum tipo de resposta ao estresse ambiental, como consequência de atividade antrópica. CONGO *et al*, (2009).

Cada enzima apresenta uma estrutura tridimensional particular com um sítio ativo que se liga ao substrato específico, ditada pela ordem dos aminoácidos na sua cadeia, porém tal estrutura pode ser desnovelada, ou desnaturada, quando os compostos tóxicos se ligam à estrutura, sendo convertida em uma cadeia polipeptídica flexível que perdeu a sua conformação original, que pode torná-la inativa. LEHNINGER *et al* (1995).

Os organismos aquáticos representam uma importante fonte de biomoléculas ativas. A obtenção de enzimas por meio de subprodutos da pesca é de grande importância uma vez que enzimas digestivas de baixo custo poderiam promover novas aplicações na indústria com o auxílio da biotecnologia, além de evitar o descarte indevido e a degradação desses insumos no meio ambiente. KLOMKLAO *et al*, (2008).

Entre os crustáceos, o *Ucides cordatus* (LINNAEUS 1763) ocupa uma posição particularmente importante devido à sua distribuição geográfica contínua. Este caranguejo vive exclusivamente em ecossistemas tropicais e subtropicais de manguezais HATTORI E PINHEIRO, (2003). A espécie de caranguejo *Ucides cordatus* caracteriza-

se como um importante recurso muito explorado pelas comunidades localizadas no entorno dos empreendimentos portuários da Ilha de São Luís. – Maranhão PINHEIRO-SOUSA *et al.*, (2013).

A principal glândula digestiva dos crustáceos é o hepatopâncreas onde é produzida e secretada a maior parte das enzimas digestivas ICELY & NOTT, (1992; LEMOS *et al.*, (2000). Como no caso do fígado dos vertebrados, o hepatopâncreas dos invertebrados é um órgão sensível aos danos causados por poluentes existentes no meio externo LI e COL., (2007). Embora algumas espécies de crustáceos habitem ambientes com altas concentrações de metais, suas funções vitais, de modo geral, mantêm-se preservadas. Porém, podem ocorrer alterações nos processos de excreção e formas de detoxificação HARRIS & SANTOS, (2000) ao interferir na atividade das enzimas de um modo geral.

A α -amilase é uma endocarbohidrase que é encontrada em diversos organismos, como exemplo, os animais, fungos, bactérias e vegetais. Ela é responsável pela hidrólise ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ presentes em macromoléculas de amido e glicogênio, gerando como produtos oligossacarídeos, α -dextrinas e maltose GUPTA *et al.*, (2003); VAR DER MAAREL, (2003); GUANDALINI, (2007); CASTRO *et al.*, (2010). Dentre as enzimas industriais, atualmente as amilases representam aproximadamente 25% do mercado enzimático mundial, apresentando grande aplicação biotecnológica GUPTA, (2003) BORGIO, (2011); KUMAR, *et al* (2012).

Desta forma o presente trabalho tem como o objetivo caracterizar e avaliar a potencialidade de amilases digestivas de *Ucides cordatus*, como biomarcadoras de metais pesados.

MATERIAL E MÉTODOS.

Aquisição dos caranguejos

Foram utilizados 8 espécimes de *Ucides cordatus* adquiridos juntos a pescadores de São Luís- Maranhão, Brasil. Levados ainda vivos ao Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos (BioAqua) do Departamento de Oceanografia/UFMA. Os animais foram sacrificados através de imersão no gelo (0°C). Após a biometria dos exemplares os hepatopâncreas foram retirados para estudos referentes as enzimas digestivas.

Preparação do Extrato bruto

Os hepatopâncreas dos caranguejos foram homogeneizados no agitador mecânico IKA RW 20 Digital em solução de fosfato de sódio 10 mM, pH 7,5 (200mg/mL) em baixa temperatura. O material homogeneizado foi centrifugado a 10.000 xg por 25 minutos a 4°C para a remoção de partículas insolúveis. O sobrenadante (Extrato Bruto), foi separado, acondicionado em baixa temperatura e utilizado nas próximas etapas de purificação BEZERRA.,(2005).

Semi-Purificação do extrato bruto

O EB foi parcialmente purificado em um procedimento de dois passos: (1) tratamento térmico e (2) Fracionamento com sulfato de amônio. Realizou-se o tratamento térmico do EB para seleção de enzimas termoestáveis durante 30 min a 45°C, em seguida foi centrifugado a 10.000 rpm durante 25 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido para a etapa seguinte. Após o tratamento térmico o extrato bruto aquecido (EBA) foi submetido ao fracionamento salino, através da precipitação das proteínas com sulfato de amônio, com graus de saturação entre 0-30% (F1) e 30-60% (F2) BEZERRA (2001). Estas frações foram dialisadas em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,5, durante 24 h a 4 ° C e utilizado nos ensaios seguintes.

Dosagem de proteínas

A concentração de proteína das frações foi obtida medindo a absorvância no espectrofotômetro (NanoDrop 2000 - Thermo Scientific) a 260 nm e 280 nm, com base no método proposto por Warburg e Christian (1941), usando a equação: **[proteína] mg ml⁻¹ = A₂₈₀ x 1,5 - A₂₆₀ x 0,75.**

Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE

Após o processo de purificação parcial, foi realizado eletroforese SDS-PAGE com o método de Laemmli (1970), usando gel de acrilamida. No gel foram aplicados o marcador de peso molecular, 100 µg de proteína de cada amostra resultante da

purificação parcial de *Ucides cordatus* (EB, EBA, F1, F2). A corrida da eletroforese ocorreu sob condutividade variável e amperagem constante (11 mA). Após a corrida, o gel foi corado em solução 0,25 % de Azul de Coomassie Brilliant por 30 min. Após esse período o gel foi descorado em solução contendo 10% de ácido acético e 25 % de metanol. O peso molecular das bandas foi estimado utilizando um padrão de peso molecular com massa molecular entre 116 a 20 kDa (SigmaMarker™).

Determinação da atividade Amilolítica

A atividade da amilase foi determinada de acordo com o método de Bernfeld (1955) utilizando 125µl amido solúvel 2% como substrato, 20 µl de cada fração (EB, EBA, F1, F2 E SF) com 125 µl de fosfato de sódio a 10 M pH 7,5 a 37 ° C por 10 min. Todos os ensaios foram realizados em duplicada com um branco para cada condição. Retirou-se 30 µl de cada reação, adicionou-se em tubos com 300 µl de 3,5-dinitrossalicílico (DNS) a 100°C. A atividade foi medida estimando os açúcares redutores liberados após esse tempo. Foi retirado 200 µl de cada tubo, em seguida adicionando na microplaca e lido no leitor de microplaca (TP – Reader, THERMOPLATE) a 492nm.

O cálculo da atividade amilolítica foi feito através do método de determinação de açúcares redutores obtendo-se a quantidade padrão com diluições seriadas de uma solução de glicose a 0,1 g/100 ml. Com os resultados de absorbâncias das soluções padrão, foi construído um gráfico de absorbância em função da concentração de glicose (mg/ml) para calcular a equação da reta. A partir da equação da reta, foi feito o calculo da concentração de glicose, considerando nos cálculos a absorbância efetuada na amostra. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 ug de maltose por minuto.

Efeito de pH

As atividades das amilases foram avaliadas em diferentes condições de pH, utilizando amido como substrato. Para os ensaios foram utilizados os Tampões: NaOH/glicina (9 -11,5) 1 M , Citrato fosfato (4,5 - 7) 1 M e Tris-HCl: (7 – 8) 0,5 M. Todos os ensaios foram realizados em duplicada com um branco para cada condição.

Efeitos da temperatura

Os efeitos da temperatura sobre a atividade das enzimas foi avaliado em temperaturas de 25° a 60 °C com intervalos de 5°C. Os resultados foram expressos em atividade relativa com a temperatura na qual as enzimas apresentaram melhor atividade como 100%.

Efeitos de íons metálicos

O efeito de íons metálicos sobre a atividade amilolítica foi realizado de acordo com a metodologia adaptada de SOUZA, *et al* (2007). Os íons Ca^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+3} , Al^{+3} , Ba^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} e Na^{+} foram avaliados na concentração de 0,007; 0,0007 e 0,00007 mM. As amostras contendo amilase e solução de íon (1: 1) foi incubada durante 30 min a 37 ° C, em seguida, a atividade amilolítica foi verificada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Purificação parcial de amilases de *Ucides cordatus* e SDS-PAGE

O processo de purificação parcial de amilases do hepatopâncreas de *U. cordatus* está resumido na Tabela 1. O extrato bruto apresentou atividade específica inicial de 0,53 U / mg, e após o primeiro passo (tratamento térmico), a atividade específica do EBA foi 0,73 e o rendimento foi 27,86%. O tratamento térmico é um importante passo de purificação de proteínas digestivas de organismos aquáticos, pois desnatura e remove proteínas não resistentes ao calor ainda no extrato bruto BEZERRA, (2001). Este procedimento produziu um extrato enzimático parcialmente purificado de 1,39% do EBA em relação ao extrato bruto de 1%. O segundo passo (fracionamento de sulfato de amônio), a fração 0-30% (F1) e 30-60% (F2) apresentaram rendimentos de 1,49% e 7,21%, respectivamente. O sulfato de amônio é o sal mais utilizado para precipitação de proteínas, devido a alta solubilidade e produção de força iônica, é uma técnica rápida e econômica e eficiente pra separar enzimas de outras proteínas encontradas no extrato (SANTOS 2014). Os resultados da eletroforese na Figura 1, a fração 2 (F2) quando aplicada ao gel SDS-PAGE, mostrou a migração de três bandas,

em que duas se destacaram-se das demais, com massa molecular estimada em 24 kDa, mostram proteínas entre 30-34 kDa, corroborando com os pesos moleculares de amilases de hepatopâncreas de outros caranguejos de zona subtropical do gênero *Neohelice*, que estão entre 26-37 kDa VAN WORMHOUDT *et al.*, (1995); ASARO, *et al* (2017), estes estudos detectaram a massa molecular das amilases com a técnica de zimogramas, utilizando amido como substrato, que permitiu a identificação de várias isoformas de amilases.

Frações de amilase	Atividade Amilolítica Total (U)	Proteína Total (mg)	Atv. Especifica (U/mg)	Rendimento (%)	Purificação
EB	1641,05	3123,19	0,53	100,00	1,00
EBA	457,25	626,32	0,73	27,86	1,39
F1(0-30%)	24,39	68,62	0,36	1,49	0,68
F2(30-60%)	118,32	169,03	0,70	7,21	1,33

Tabela 1: Purificação parcial de amilases de *Ucides cordatus* do hepatopâncreas. Proteína total e Atividades enzimáticas foram estabelecidas, respectivamente de acordo com Warburg and Christian (1941) e Bernfeld (1955) utilizando amido solúvel 2% como substrato. Extrato bruto (EB), extrato bruto aquecido (EBA), fração 1 (F1), fração 2 (F2).

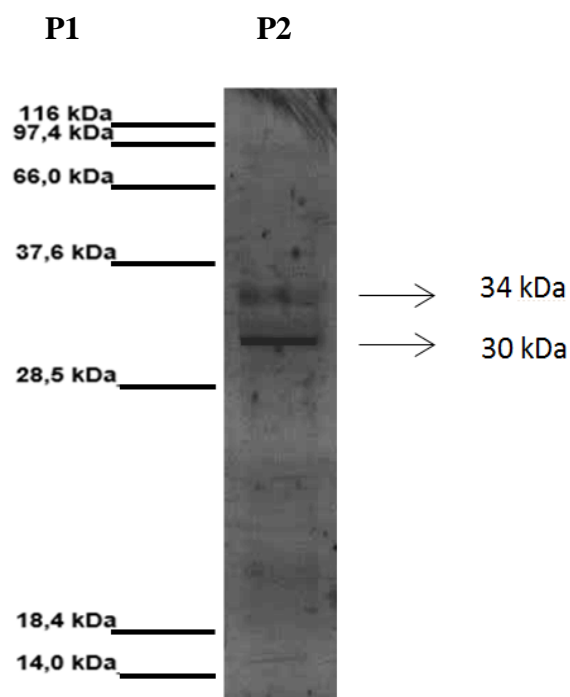


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE das proteínas obtidas dos hepatopâncreas de *Ucides cordatus*. No perfil 1 : padrão de peso molecular; Perfil 2: fração 2 obtida da purificação parcial com sulfato de amônio. Os pesos moleculares das proteínas foram estimados em 30 - 34 kDa.

Caracterização bioquímica de amilases extraídas de *Ucides cordatus*

Após as etapas de purificação, as propriedades físico-químicas das amilases parcialmente purificadas foram investigadas. A atividade das amilases extraídas do hepatopâncreas do *Ucides cordatus* foi verificada dentro da faixa de pH 5,0 á 7,0. Sendo o pH ótimo 6 e 7,0 (Figura 2.A), O resultados está de acordo com valores de pH ótimo do caranguejo de lama *Scylla serrata* PAVASOVICÉ , *et al* (2004) e do Caranguejo marinho *Thalamita crenata* , VAN WEEL, *et al* (1960). indicando que a digestão de carboidratos no hepatopâncreas ocorre principalmente em meio ácido ao neutro, diferente do que ocorre em outros organismos aquáticos como peixes , em que a digestão de carboidratos ocorre em meio alcalino, FERNÁNDEZ *et al* , (2001). As amilases de *Ucides cordatus*, exibiram temperatura ótima dentro da faixa de 45 a 55°C. (Figura 2.B). A atividade foi mantida em baixa temperatura (10 ° C) e sofreu uma queda acentuada na atividade a temperaturas acima de 55 ° C . O caranguejo *Ucides cordatus* está distribuído em regiões litorâneas, especialmente no nordeste e norte do Brasil,

como consequência de sua localidade em regiões costeiras tropicais e subtropicais, é exposta a uma ampla gama de temperaturas, NORDHAUS & WOLFF, (2007); ALONGI (2009), sendo muito tolerante a temperaturas extremas. Estes resultados também corroboram com estudos sobre as adaptações fisiológicas de animais ectodérmicos, ARRUCHALAM & HAARD, (1985); SIMPSON & HAARD, (1987); ÁSGEIRSSON *et al*, (1989); RAA, (1990); DE VECCHI & COPPES, (1996), em que as enzimas desses organismos apresentam atividades enzimáticas maiores, de acordo com o ambiente em que se encontram.

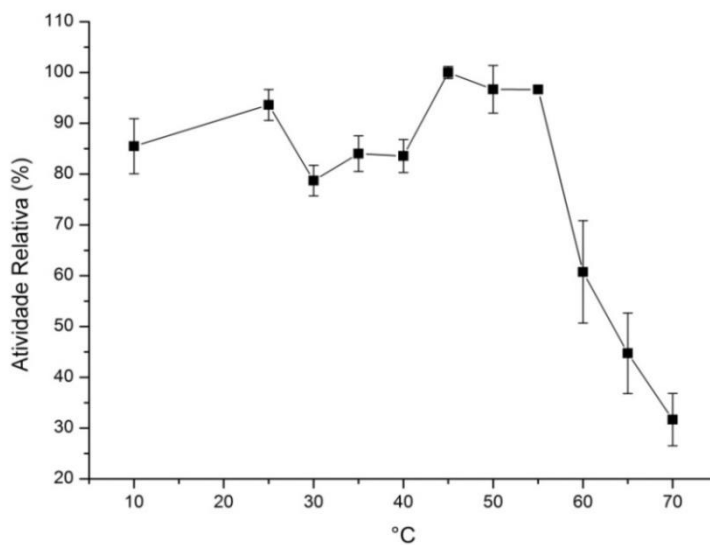
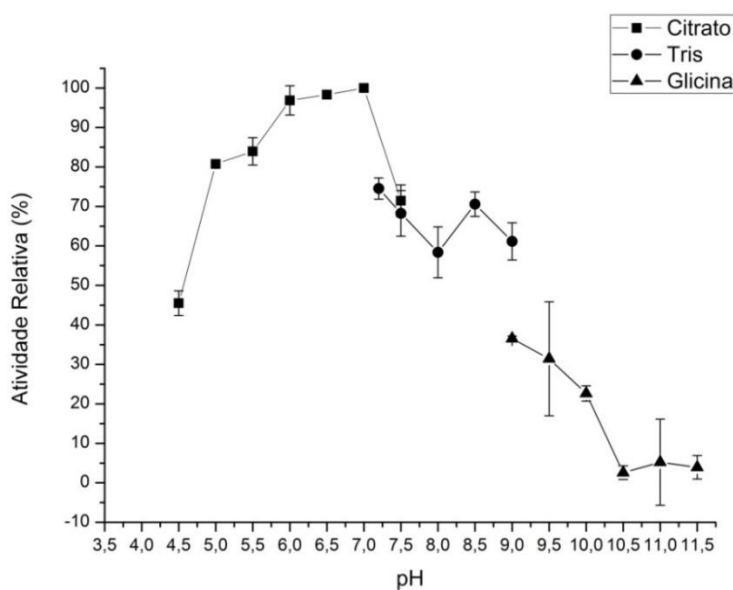


Figura 2. Efeitos de (a) pH, (b) temperatura os ensaios foram realizados com valores de pH de 4,5 a 11,5 e as temperaturas variando de 10 a 70 ° C.

Potencial uso de amilases de *Ucides cordatus* como biomarcador de metais pesados

Embora o papel central das enzimas digestivas seja encontrado nos processos dietéticos de clivagem e absorção, poucos estudos se têm encontrado na literatura que examinaram a atividade das amilases em caranguejos tropicais sob os efeitos da contaminação ou seu potencial como biomarcador. Sabe-se que as concentrações sub-letais de metais podem inibir a atividade de enzimas digestivas de uma espécie exposta, e reduzir a captação de energia, comprometendo a sobrevivência, o crescimento, e a reprodução de organismos, COSTA *et al* (2007).

No presente estudos, o efeito de vários íons na atividade amilolítica de *Ucides cordatus* foi testado em concentrações de 0,007, 0,0007 e 0,00007 mM. Na concentração 0,007 mM íons, tais como Fe^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Ba^{+2} , aumentaram a atividade de amilases parcialmente purificada de 11% a 19%, e Mg^{+2} , Na^{+} e Al^{+3} de 27% a 36%, ao contrario de Hg^{+3} que teve a atividade amilolítica fortemente inibida em 95% (Tabela 2.A). Os valores das concentrações do mercúrio quando submetidos aos ensaio de atividade, ficaram a uma concentração final de 0,007 mM, que é o que vale á 1,40 mg/L de mercúrio. Os resultados para mercúrio foram semelhantes nas concentrações mais baixas de 0,0007 e 0,00007 mM. Isso mostra uma alta sensibilidade da enzima em altas concentrações do metal.

Um estudo com amilases parcialmente purificada de hepatopâncreas de *N. granulata* tiveram sua atividade maior na presença de Mg^{+2} e Ba^{+2} (ASARO *et al*, 2017). Amilases dos peneídos, teve a atividade fortemente inibida por Hg^{2+} , Cu^{2+} e Al^{3+} com concentrações de 1, 5 e 10 mM, CASTRO *et al* (2012). O efeito dos íons metálicos na enzima é específico da espécie, como sugerido pelos resultados diferentes relatados na literatura (MURALISANKAR *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2014). Os resultados desse estudo ficaram 700 vezes acima dos estabelecidos pela CONAMA, 357/2005 que é de 0,0002 mg/L para o Mercúrio (Hg).

Dessa forma altas concentrações de mercúrio, podem ser identificadas utilizando amilases parcialmente purificadas de *Ucides cordatus*. Pois a presença desse íon metálico em uma concentração menor que 0,1 mM inibe a atividade das amilases, conseqüentemente, afetando o processo de digestão de carboidratos nesse organismo, indicando a presença de mercúrio.

Íons (0,007 mM)	Atividade residual \pm SD (%)	A
Controle	100 \pm 0	
Fe ²⁺	119,3 \pm 0,09	
Na ⁺	126,02 \pm 0,006	
Ca ²⁺	111,7 \pm 0,04	
Hg ³⁺	4,85 \pm 0,02	
Ba ²⁺	119,9 \pm 0,06	
Cu ²⁺	119,8 \pm 0	
Al ³⁺	127,1 \pm 0,006	
Mg ²⁺	136,6 \pm 0,006	

Íons (0,0007 mM)	Atividade residual \pm SD (%)	B
Controle	100 \pm 0	
Fe ²⁺	109,2 \pm 0,04	
Na ⁺	107,61 \pm 0	
Ca ²⁺	102,2 \pm 0	
Hg ³⁺	4,91 \pm 0,17	
Ba ²⁺	105,07 \pm 0,01	
Cu ²⁺	107,83 \pm 0	
Al ³⁺	107,80 \pm 0	
Mg ²⁺	107,33 \pm 0,09	

Íons (0,00007 mM)	Atividade residual \pm SD (%)	C
Controle	100 \pm 0	
Fe ²⁺	106,15 \pm 0,14	
Na ⁺	112,66 \pm 0,09	
Ca ²⁺	111,04 \pm 0	
Hg ³⁺	4,98 \pm 0,1	
Ba ²⁺	114 \pm 0	
Cu ²⁺	114,50 \pm 0	
Al ³⁺	104,63 \pm 0,07	
Mg ²⁺	113,29 \pm 0,03	

Tabela 2. Efeito de íons em amilases parcialmente purificadas de *Ucides cordatus*. Os resultados são representados por média \pm desvio padrão (SD).

CONCLUSÕES

- A purificação parcial de amilases de *Ucides cordatus* foi eficiente para a obtenção de uma fração rica em amilases.
- A atividade das amilases foi inibida na presença de Hg^{3+} , o que pode sugerir o potencial uso de amilases de *Ucides cordatus* como biomarcador para este metal pesado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Maranhão-FAPEMA e ao Laboratório de Pós-graduação em Oceanografia-PPGO.

REFERÊNCIAS

1. ALINK, G. M. GENTOXINS IN WATERS. IN: SORNA, M; VANIO, H (eds). , 1982. Mutagens in our Environment. Alan R. liss, New York, p 261-276
2. ALVES, R.R.N. AND NISHIDA, A.K. 2004. Population structure of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) in the Estuary of the Mamanguape River, Northeast Brazil. *Tropical Oceanography*, 32(1): 23-37.
3. ASPMO, S.I.; HORN, S.J.; EIJSINK, V.G.H 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) viscera. *Process Biochemistry*, v.40, p.1957-1966,
4. BERNFELD, P. 1955. Amylases, α and β , pp. 149-158. In, *Methods of Enzymology*. Vol. 1. 1st Edition. Academic Press, New York.
5. BEZERRA RS, LINS EJF, ALENCAR RB, PAIVA PMG, CHAVES MEC, COELHO LCBB, CARVALHO LB JR, 2005. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochem*, 40:1829–1834.
6. BEZERRA, R.S.; SANTOS, J.F; PAIVA, P.M.G; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; VIEIRA, V.L.A.; CARVALHO JR., L.B 2001. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Food Biochemistry*, V. 25, p. 199-210.
7. BORGIO, J. F. 2011. Immobilization of microbial (wild and mutant strains) amylase on coconut fiber and alginate matrix for enhanced activity. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 01, n. 03, p. 255-264.
8. BRYAN, G. W. 1979. Bioaccumulation of marine pollutants. *Philos trans. R. Soc. Lond. Ser. B*, v. 286, 483-505.
9. CASTRO, A. M.; CARVALHO, D. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO , L. R. 2010. Economic analysis of the production of amylases and other hydrolases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of babassu cake. *Enzyme Research*, p. 1-9.
10. CASTRO, A.C.L.; CORREIA, M.L.F.; NASCIMENTO, A.R.; PIEDADE-JUNIOR, R.N.; GAMA, L.R.M.; SOUSA, M.M.; SENA, A.C.S. AND SOUSA, R.C.C. 2008. Aspectos bioecológicos do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus cordatus L.*, 1763).

11. CHEUNG, C. C. C; SIU, W. H. L; RICHARDSON, B. J; DE LUCA-ABBOTT, S. B.; LAM, P. K. S. 2004. Antioxidant responses to benzo [a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Eviron Pollut.*, 128, p. 393-403.
12. COGO A. JD, SIQUEIRA A. F. RAMOS . A. C, CRUZ ., Z. MA & SILVA ., A.G 1,6. 2009. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras. *Natureza on line* 7 (1): 37-42.
13. COSTA, H.M.S.; FREITAS-JÚNIOR, A.C.V.; AMARAL, I.P.G.; HIRATA, I.Y.; PAIVA, P.M.G.; CARVALHO JR., L.B ; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R.S. 2013. Metal-sensitive and thermostable trypsin from the crevalle jack (*Caranx hippos*) pyloric caeca: purification and characterization. *Chemistry Central Journal*, V. 7, p. 166.
14. FRANÇA, R.C.P; AMARAL, I.P.G.; SANTANA, W.M.; SOUZA-SANTOS, L.P.; CARVALHO JR, L.B.; BEZERRA, R.S. 2010. Proteases from the harpacticoid copepod *tisbe biminiensis*: comparative study. *Journal of Crustacean Biology*, v. 30, p. 122-128.
15. FREITAS-JÚNIOR, A.C.V.; COSTA, H.M.S.; BEZERRA, R.S.; ICIMOTO, M.Y.; MARCONDES, M.; OLIVEIRA, V.; HIRATA, I.Y.; CARVALHO JR, L.B. 2012. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chemistry*, V. 133, p. 1596-1602.
16. GUANDALINI, N. C. 2007. Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium ansioptiae* utilizando resíduos amiláceos como substrato. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.
17. GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological Enzyme Research perspective. *Process Biochemistry*, v. 38, no. 11, p. 1599–1616.
18. HATTORI, G.Y. AND PINHEIRO, M.A.A. 2003. Fertilidade do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (Linnaeus) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) em Iguape, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20(2): 309-313.
19. HELLAWELL JM .1986 . Os indicadores biológicos de poluição de água doce e gestão ambiental. Elsevier, Londres, p 546, CrossRef. à Instrução Normativa, Brasília, DF. Diário Oficial da União, 102: 136-142.

20. ICELY, J.D., NOTT, J.A., 1992. Digestion and absorption: Digestive system and associated organs. Em: Microscopic Anatomy of Invertebrates. Vol. 10, Decapoda Crustacea, Nova Iorque. Ed. Wiley-Liss, p 147-201.
21. KUMAR, V.; SAHAI, V.; BISARIA, V. S. 2012. Production of amylase and chlamydospores by *Piriformospora indica*, a root endophytic fungus. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 1, p. 124-128,.
22. LEHNINGER AL, NELSON DL & COX MM. 1995. Princípios de Bioquímica. 2.ed. São Paulo: Savier.
23. LEMOS, D., EZQUERRA, J.M., GARCIA-CARRENO, F.L., 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: 423 digestive proteinases, proteinase inhibitors and feeding digestibility. Aquaculture 424 186, 89–105.
24. LI, N; ZHA, Y. ; YANG, J. 2007. Impact of waterborne copper on the structure of gills and hepatopâncreas and its impact on the content of metallothionein in juvenile giant freshwater prawn *macrobrachium rosenbergii* (crustacean: Decapoda). Arch environ contam toxicol 25(1): 73-79.
25. MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. 2006. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger* : a comparative study with commercial detergent formulations. Bioresour. Technol., v. 97, p. 1217–1224.
26. MMA. 2014. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº 445/2014, de 18 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos. Diário Oficial da União, 256: 126-130.
27. NG, P.K.L.; GUINOT, D. AND DAVIE, P.J.F. 2008. Systema brachyurorum: Part 1. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. The Raffles Bulletin of Zoology, 17: 1–286.
28. PAPAGIANNIS, L., KAGALOU, L., LEONARDOS, J., PETRIDIS, D., E KALFAKAKOU, V. 2004. Cobre e zinco em quatro espécies de peixes de água doce do lago Pamvotis (Grécia). Environ. Int., 30: 357-362.
29. PINHEIRO-SOUSA, D. B.; ALMEIDA, Z. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F. 2013. Integrated analysis of two biomarkers in *Sciades herzbergii* (Ariidae, Siluriformes), to assess the environmental impact at São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil. Latin American Journal of Aquatic Research, v. 41, n. 2, p. 305-312.

30. PREGO, R, COBELO-GARCÍA, A., 2003. Twentieth century overview of heavy metals in the Galician Rias (NW Iberian Peninsula). *Environmental Pollution* 121, 42-452.
31. RODRIGUES, A.M.T.; BRANCO, E.J.; SACCARDO, S.A. AND BLANKENSTEYN, A. 2000. A exploração do caranguejo *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) e o processo de gestão participativa para normatização da atividade na região sudeste-sul do Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 26(1): 63-78.
32. SANDER MJ. 1997. A avaliação de campo do caranguejo de água doce, *potamonautes warreni*, como um indicador de bio-acumulativos de poluição por metais. M.Sc. Tese. Universidade Afrikaans Rand, África do Sul.
33. SANTOS, F.M.S.; RIBEIRO, K.; FREITAS-JUNIOR, A.C.V.; CARVALHO JR, L.B.; VALENTI, W.C.; BEZERRA, R.S. 2014. Digestive proteases from wild and farmed male morphotypes of the amazon river prawn (*Macrobrachium amazonicum*). *Journal of Crustacean Biology*, V. 32, p. 189-198.
34. SHAHIDI, F.; JANAKKAMIL, Y.V.A. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science e Technology*. Vol. 12, pp. 435-464,.
35. SOUZA, A.A.G.; AMARAL, I.P.G.; ESPÍRITO SANTO, A.R.; CARVALHO JR, L.B.; BEZERRA, R.S. 2007. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). *Food Chemistry*, v.100, p.1429-1434.
36. ŠTEVČIĆ, Z. 2005. The reclassification of brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Natura Croatica*, 14(1): 1-159.
37. VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.

5. ANEXO

NORMAS DO PERIODICO BOLETIM DO LABORATORIO DE HIDROBIOLOGIA

O Boletim do Laboratório de Hidrobiologia não cobra custos de processamento e nem de submissão de artigos.

Os trabalhos deverão seguir as seguintes normas:

1 Título

O título, em negrito e caixa alta, deverá ser o mais conciso possível e dar clara ideia sobre o conteúdo do artigo. Um título abreviado deve ser fornecido para impressão nas cabeças de páginas.

2 Autores

Para assegurar a integridade da avaliação por pares cega, para submissões à revista, exige-se que os nomes dos autores não sejam incluídos no arquivo a ser submetido. Evitando-se, assim, que não sejam reveladas a identidade de autores e avaliadores entre os mesmos durante o processo.

Os dados dos autores devem ser informados durante o processo de submissão no próprio site. Os nomes dos autores devem ser escritos em minúsculas e um abaixo do outro, como segue:

Zafira da S. de Alemida¹

Verônica Fonsêca-Genevois²

Deve-se informar a instituição de origem e o endereço eletrônico de cada autor.

3 Resumo e Abstract

Todos os trabalhos deverão apresentar um resumo em português e inglês sumariando resultados e conclusões. Estes deverão constar no início do trabalho e iniciar com o título traduzido para o idioma correspondente.

4 Palavras-chave

Os autores deverão apresentar de 3 a 5 palavras-chave em português e inglês.

5 Texto

O corpo principal do trabalho deverá ser dividido em Introdução, Material e Métodos,

Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências Bibliográficas. O título de cada uma das seções deverá estar centralizado e escrito em caixa alta. Sub-seções, quando houver, deverão ter seus títulos alinhados à margem esquerda e escritos em minúsculas.

6 Citações

No corpo principal do trabalho os autores deverão observar as seguintes normas: para um autor – Tundisi (1993); para dois autores – Sasaki & Felipe (1997); para três ou mais autores – Guerra et al. (1997). No item Referências Bibliográficas os trabalhos citados no texto deverão ser apresentados da seguinte forma:

TUNDISI, J.G. 1993. Theoretical basis for reservoir management. Verh. Internat. Verein. Limnol., 25: 1153-1156.

GUERRA, R.F., SILVEIRA, N.L.D. da, BERNARDI, N. & LEGAL, E.J. 1997. Hand preference during behavioral tests and spontaneous activity in two species of common marmoset (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*). Rev. Bras. Biol., 57(4): 563-570.

SCHOWERBEL, J. 1975. Métodos de hidrobiologia. Madri: H. Blume. 262 p.

7 Ilustrações

Fotografias, desenhos, gráficos e mapas devem ser denominados figuras. As ilustrações devem ser preparadas levando-se em consideração que o tamanho da página útil é de 22,0 cm X 15,0 cm, e apresentadas em sentido vertical com resolução mínima de 300 dpi. Tabelas e figuras devem ser numeradas com algarismos arábicos e chamadas no texto em ordem crescente (p.ex. Figura 1, Tabela 1).

Tabelas e gráficos devem ser preparados em Excel 4.0 ou superior, armazenados e enviados em arquivos individuais. Desenhos e mapas esquemáticos devem ser feitos a traço de nanquim. No momento, apenas fotografias em preto e branco são impressas no Boletim, sendo necessário o envio das fotos originais.

8 Considerações finais

Os trabalhos devem ser enviados em três vias digitados em papel A4, espaço duplo, com margens de 2,5 cm. Após as correções os autores devem enviar um original e cópia em CD/DVD (Word 2007 ou versão superior, Times New Roman, fonte 12). Os autores devem enviar suas correspondências para: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO/ DEPARTAMENTO DE OCEANOGRFIA E LIMNOLOGIA/ LABORATÓRIO DE HIDROBIOLOGIA

Comissão Editorial do Boletim do Laboratório de Hidrobiologia.

Av. dos Portugueses s/n - 65085-580 - São Luís, MA - Brasil

Fone: 0xx98 3272-8583/ 8561

E-mail: boletimlabohidro@gmail.com

B. Lab. Hidro.

ISSN 1982-6421 (on-line)

ISSN 0102-4337 (impresso)